



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENT- UND  
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 199 38 092 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 199 38 092.9  
㉔ Anmeldetag: 12. 8. 1999  
㉕ Offenlegungstag: 22. 2. 2001

㉙ Int. Cl.<sup>7</sup>:  
**C 07 H 19/073**  
C 07 H 19/173  
C 07 H 1/00  
B 01 J 19/12  
C 07 H 21/00

DE 199 38 092 A 1

㉙ Anmelder:  
Epigenomics GmbH, 10435 Berlin, DE  
  
㉚ Vertreter:  
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,  
10119 Berlin

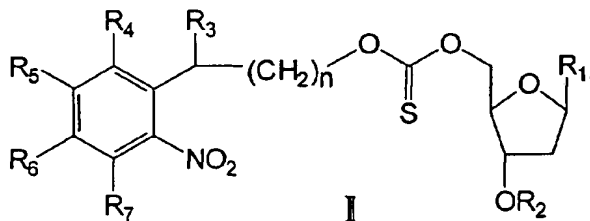
㉚ Erfinder:  
Berlin, Kurt, Dr., 14532 Stahnsdorf, DE  
  
㉛ Entgegenhaltungen:  
WO 94 10 128 A1  
Nucleosides and Nucleotides 17 (1998) 1987-1996;

**Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen**

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

- ㉜ Nucleosidderivate und Verfahren zu deren Herstellung  
㉝ Beschreiben werden neue Nucleosidderivate der allgemeinen Formel I

leicht spalten und werden für die Synthese von Oligonucleotiden verwendet.



worin

R 1 eine Nucleobase oder eine mit mindestens einer Schutzgruppe versehene Nucleobase darstellt,  
R 2 ein H-Atom oder eine Diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl-Gruppe bedeutet,  
R 3 ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist,  
R 4 ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen darstellt,  
R 5 und R 6 unabhängig voneinander ein H-Atom, ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen oder ein Alkoxyrest mit bis zu 4 C-Atomen bedeuten oder zusammen eine Methylendioxygruppe darstellen,  
R 7 ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist und  
n die Zahl 0 oder 1 bedeutet.  
Die neuen Nucleosidderivate lassen sich mittels UV-Licht

DE 199 38 092 A 1

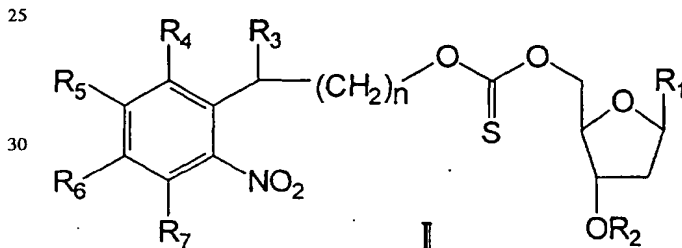
Die vorliegende Erfindung betrifft neue Nucleosidderivate sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

Photolabile Schutzgruppen wurden vor allem für die Synthese von Oligomeren bereits vielfach beschrieben. Besonders populär ist ihr Einsatz für die Synthese von Peptiden und im Gebiet der kombinatorischen organischen Synthese. Die Photolyse der Schutzgruppen ist eine vergleichsweise milde Alternative zur traditionellen basischen oder sauren Entschützung und ist deshalb vor allem auch für die Synthese empfindlicher Biomoleküle besonders geeignet. In diesem Zusammenhang wurden vor allem zahlreiche Derivate mit ortho-Nitro-benzyl-Funktionen erfolgreich eingesetzt, so auch für die Synthese von Oligonukleotiden z. B. auf Oberflächen zur Herstellung von Oligonukleotid Arrays (sogenannte biochips). Photospaltbare Schutzgruppen sollten zudem stabil gegenüber basischen und sauren Reagenzien sein, die in einer mehrstufigen Synthese zur Anwendung kommen, und vor allem keine hochreaktiven Nebenprodukte bilden.

Zur Synthese von Oligonukleotiden unter Verwendung photolabiler Schutzgruppen wurden bislang fast ausschließlich Nucleosidderivate verwendet, die an der 5'-Position mit einer derivatisierten o-Nitrobenzyloxycarbonyl oder einer 2-(o-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Funktion geschützt waren. Diese lassen sich beispielsweise durch Bestrahlung mit einer Hg-Lampe effektiv abspalten, wobei die Emissionslinie bei 313 nm entscheidend ist. Bekannt sind beispielsweise für die kommerzielle Synthese von Oligomer Arrays ebenfalls o-Nitrobenzyloxycarbonyl-geschützte Nucleosidderivate. Nucleosidbausteine mit photolablen Schutzgruppen des 2-(o-Nitrophenyl)ethoxycarbonyl-Typs sind gleichfalls bekannt. Die beschriebenen Schutzgruppen benötigen jedoch für eine vollständige Abspaltung vom Nucleosidbaustein noch immer relativ lange, meist werden Bestrahlungszeiten von einigen Minuten benötigt, wobei bei empfindlichen Biomolekülen wie DNA auch mit Nebenreaktionen gerechnet werden muß.

Die Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher Nucleosidderivate zur Verfügung zu stellen, welche sich leicht photolysieren lassen.

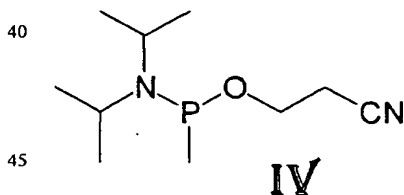
Die Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, daß Nucleosidderivate der allgemeinen Formel I geschaffen werden,



worin

R<sub>1</sub> eine Nucleobase oder eine mit mindestens einer Schutzgruppe versehene Nucleobase darstellt,

R<sub>2</sub> ein H-Atom oder eine Diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl-Gruppe der Formel IV



bedeutet,

R<sub>3</sub> ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist,

R<sub>4</sub> ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen darstellt,

R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> unabhängig voneinander ein H-Atom, ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen oder ein Alkoxyrest mit bis zu 4 C-Atomen bedeuten oder zusammen eine Methylendioxygruppe darstellen,

R<sub>7</sub> ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist und

n die Zahl 0 oder 1 bedeutet.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es dabei, daß R<sub>1</sub> Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil oder Hypoxanthin ist, welche gegebenenfalls eine Schutzgruppe tragen.

Weiterhin ist es erfindungsgemäß bevorzugt, daß

R<sub>3</sub> ein H-Atom, eine Methyl- oder eine Ethylgruppe ist.

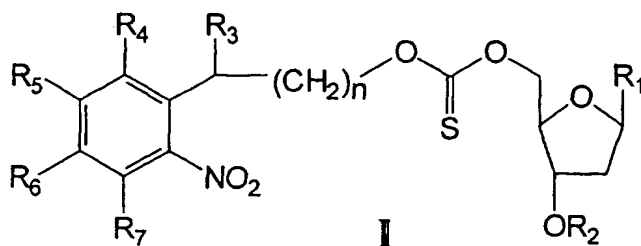
Es ist ferner bevorzugt, daß

R<sub>4</sub> ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder eine Methylgruppe ist.

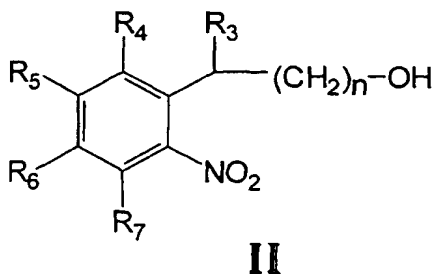
Weiterhin ist bevorzugt, daß

R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> unabhängig voneinander ein H-Atom oder eine Methyl-, Ethyl-, Methoxy- oder Ethoxygruppe darstellen oder zusammen eine Methylendioxygruppe bilden.

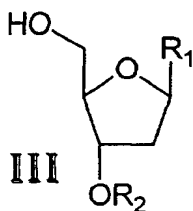
Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines Nucleosidderivats der allgemeinen Formel I



worin die Reste  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  und  $R_7$  sowie  $n$  die oben angegebene Bedeutung haben, wobei man in an sich bekannter Weise eine Verbindung der allgemeinen Formel II



worin die Reste  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  und  $R_7$  sowie  $n$  die oben angegebene Bedeutung haben, mit Thiophosgen umgesetzt und die so erhaltenen Thiocarbonylchloride mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III



worin die Reste  $R_1$  und  $R_2$  die oben angegebene Bedeutung haben, umgesetzt.

Die vorliegende Erfindung beschreibt einen neuen Typ von photolabilen Schutzgruppen an Nucleosidderivaten (allgemeine Formel I), die sich sehr effizient abspalten lassen.

Die Thiokohlensäureester entsprechend der Formel I lassen sich analog zu den Kohlensäureestern in zwei Schritten herstellen. Zunächst wird ein Nitrobenzylalkohol- oder ein 2-Phenylethanol-derivat mit Thiophosgen zum entsprechenden Thiocarbonylchlorid umgesetzt und anschließend mit dem jeweiligen Nucleosidbaustein gekoppelt. Dabei nehmen Nukleobase und Schutzgruppen des Nucleosidbausteins auf die Synthese wenig Einfluß. Nach dem Anbringen der photolabilen Schutzgruppe kann der Nucleosidbaustein in sein Phosphoramidit überführt werden, so daß er der etablierten Amidit-Chemie, wie sie auch auf kommerziellen DNA-Synthesizern stattfindet, zugänglich ist. Die Abspaltung der Schutzgruppen der Nucleosidderivate nach Formel I erfolgt mittels Bestrahlung mit einer Hg-Hochdrucklampe.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Verwendung der erfindungsgemäßen Nucleosidderivate zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden. Hierbei werden an sich bekannte Syntheseautomaten und/oder Pipettierroboter verwendet, um die gewünschten Oligonucleotide aufzubauen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher auch ein Kit zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden umfassend mindestens ein erfindungsgemäßes Nucleosidderivat, gegebenenfalls zusammen mit weiteren erfindungsgemäßen oder bereits bekannten Nucleosidderivaten und Reagenz- und Hilfsstoffen sowie Lösemitteln und einer Arbeitsanweisung. Die Arbeitsanweisung kann dabei auch in Form eines Computerprogramms zur Programmierung des automatischen Ablaufs der einzelnen Syntheseschritte vorliegen. Mittels dieses Kits lassen sich die gewünschten Oligonucleotide leicht mittels automatisch arbeitender Vorrichtungen herstellen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung:

#### Beispiel 1

(5'-(2-(2,6-Dinitrophenyl)ethoxysulfonyl)thymidin)

a) Darstellung von 2-(2,6-Dinitrophenyl)-1-ethanol

In einem ausgeheizten Rundkolben werden 18,2 g Dinitrotoluol in 50 ml absolutem DMSO vorgelegt und langsam mit einer Lösung von 1,8 g Kalium-tert.-butylat in 20 ml t-Butanol versetzt. Die anfangs leicht gelbliche Lösung färbt sich dabei intensiv violett. Das Reaktionsgemisch wird zunächst bei Raumtemperatur 5 Minuten und anschließend bei 70°C für 10 Minuten gerührt. Man läßt abkühlen und rührt über Nacht bei Raumtemperatur weiter. Zur Aufarbeitung neutrali-

siert man mit konzentrierter HCl und fügt 300 ml Aqua dest. hinzu. Zu der Lösung wird solange NaCl gegeben, bis die Lösung gesättigt ist. Die organische Phase wird abgetrennt und die wässrige mehrmals mit EtOAc nachextrahiert. Die vereinigten organischen Phasen werden über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Nachdem das Trockenmittel abfiltriert und das Lösungsmittel abgezogen worden ist, wird der Rückstand in etwas heißem EtOAc aufgenommen, mit 100 ml Petrolether überschichtet und zum Auskristallisieren über Nacht in den Tiefkühlschrank gestellt. Der Petrolether wird abdekantiert, der Rückstand mit wenigen Tropfen Toluol verdünnt und auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Als Laufmittel dient Toluol/EtOAc (5 : 1), die Polarität des Laufmittels kann bei nicht ausreichender Trennleistung während der Eluierung auf bis zu 3 : 1 gesteigert werden. Die Produkt enthaltenden Fraktionen werden vereinigt und das Lösungsmittel abdestilliert. Die Reaktion ergab das reine Produkt in einer Ausbeute von 10.6 g (50%), Rf-Wert (Silica60, Laufmittel Toluol/EtOAc 8 : 1) = 0,36

#### b) Darstellung von 2-(2,6-Dinitrophenyl)ethoxysulfonylchlorid

In einem ausgeheizten, mit Argon befluteten und mit einem Septum versehenen Rundkolben werden 400  $\mu\text{l}$  Thiophosgen in 2.5 ml absolutem THF vorgelegt, auf 0°C gekühlt und langsam mit einer Lösung von 1 g 2-(2,6-Dinitrophenyl)ethanol in 7.5 ml absolutem THF versetzt. Man läßt 20 Minuten unter Eiskühlung und anschließend 13/4 h bei Raumtemperatur rühren und zieht ein Kontroll-DC (Laufmittel: Chloroform). Die trübe Lösung wird über Celite abfiltriert und der Filterkuchen nochmals mit THF nachgewaschen. Nachdem das Lösungsmittel abgezogen wurde, bleibt ein tiefbrauner öliges Rückstand, der im Vakuum weiter getrocknet wird und direkt unter der Annahme einer 100%igen Umsetzung mit 2'-Desoxythymidin umgesetzt wird.

#### c) Darstellung von 5'-(2-(2,6-Dinitrophenyl)ethoxysulfonyl)thymidin

583 mg 2'-Desoxythymidin wird dreimal mit je 1.5 ml absolutem Pyridin koevaporiert, in 5 ml absolutem Pyridin aufgenommen und mittels eines Isopropanol/ $\text{N}_2$ -Bades auf -50°C gekühlt. Eine Lösung von 1 g des Thiocarbonylchlorids in absolutem Methylenchlorid wird langsam zugetropft, die Temperatur darf dabei nicht über -20°C ansteigen. Über Nacht wird bei Raumtemperatur weitergerührt. Eine DC-Kontrolle (Laufmittel Dichlormethan/Methanol = 100 : 5) zeigt einen deutlichen Produktpot, woraufhin die Reaktion abgebrochen wurde. Zur Aufarbeitung wird der Kolbeninhalt mit 50 ml Dichlormethan in einen Schütteltrichter überführt und mit 50 ml Aqua dest gewaschen. Die wässrige Phase wird mit dreimal mit jeweils 50 ml Methylenchlorid nachgewaschen, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das bis zur Trockne eingeeengte Rohprodukt wird in Dichlormethan/Methanol (2 : 1) aufgenommen auf eine Kieselgelsäule aufgetragen, als Laufmittel dient zunächst  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  = 100 : 5, der MeOH-Gradient kann zum Ende der Eluierung auf 100 : 7 gesteigert werden. Die Reaktion ergab das Produkt in einer Ausbeute von 363 mg (30%) als hellbraunes Pulver. Rf-Wert (Silica60, Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9 : 1) = 0,88

#### Beispiel 2

#### 5'-O-(2-(2-Nitrophenyl)propoxythiocarbonyl)thymidin

##### a) Darstellung von 2-(2-Nitrophenyl)propanol

In einem ausgeheizten und mit Argon befluteten Rundkolben werden 3.02 g (2.69 ml) 2-Nitroethylbenzol und 600 mg Paraformaldehyd in 10 ml DMSO vorgelegt und tropfenweise mit einer Lösung von 360 mg Kalium-t-Butylat in 4 ml t-Butanol versetzt. Nach beendeter Zugabe rührt man 15 Minuten bei Raumtemperatur und erhitzt anschließend für 13/4 h auf 70°C. Nachdem die Lösung abgekühlt ist, wird diese mit EtOAc in einen Schütteltrichter überführt und mit einer gesättigten NaCl-Lösung gewaschen. Die wässrige Phase wird zweimal mit EtOAc nachgewaschen, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{MgSO}_4$  getrocknet. Das Rohprodukt wird durch Säulenchromatographie aufgereinigt. Als Laufmittel dient Toluol/EtOAc (8 : 1), der Gradient kann zum Ende der Chromatographie auf 6 : 1 gesteigert werden. Das Produkt wird erst sehr spät eluiert und schmiert über einen weiten Bereich auf der Säule. Die Reaktion lieferte das Reinprodukt in einer Ausbeute von 2.06 g (50%) als rötliches Öl. Rf-Wert (Silica60, Laufmittel Toluol/EtOAc 8 : 1) = 0,28

##### b) 2-(2-Nitrophenyl)propoxythiocarbonylchlorid

In einem ausgeheizten, mit Argon befluteten und mit Septum versehenen Rundkolben werden 754 ml Thiophosgen in 15 ml absolutem THF vorgelegt und tropfenweise unter Eiskühlung mit einer Lösung von 1.5 g des Alkohols und 1,536 g (1,115 ml) Triethylamin in 15 ml THF versetzt. Man rührt eine Stunde unter Eiskühlung sowie eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Die Lösung wird über Celite filtriert und der Filterkuchen mit THF nachgewaschen. Das Lösungsmittel wird am Rotationsverdampfer abdestilliert und der Rückstand bei -20°C gelagert. Die Reaktion liefert das gewünschte Produkt in einer Ausbeute von 2.09 g (97%) als hellbraunes Öl.

##### c) Darstellung von 5'-O-(2-(2-Nitrophenyl)propoxythiocarbonyl)thymidin

1.48 g 2'-Desoxythymidin werden dreimal mit jeweils 15 ml absolutem Pyridin koevaporiert, in weiteren 15 ml Pyridin aufgenommen und anschließend mittels eines Isopropanol/ $\text{N}_2$ -Kältebades auf -60°C abgekühlt. Eine Lösung von 2.09 g Thiocarbonylchlorids in 20 ml absolutem Dichlormethan wird langsam zugespritzt, die Lösung wird zunächst für 6 Stunden bei -60°C und anschließend über Nacht bei Raumtemperatur weitergerührt. Eine DC-Kontrolle (Laufmittel Dichlormethan/Methanol = 9 : 1) zeigt einen deutlichen Produktpot, woraufhin die Reaktion abgebrochen wurde. Zur

Aufarbeitung wird der Kolbeninhalt mit 50 ml Dichlormethan in einen Schütteltrichter überführt und mit 50 ml Aqua dest gewaschen. Die wässrige Phase wird dreimal mit jeweils 50 ml Dichlormethan nachgewaschen, die vereinigten organischen Phasen über  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  getrocknet. Zur Reinigung wird das Rohprodukt in etwas Dichlormethan/Methanol aufgenommen und auf eine Kieselgelsäule aufgetragen. Als Laufmittel dient zunächst Dichlormethan/Methanol = 100 : 1, der MeOH-Gradient kann zum Ende der Eluierung auf 100 : 4 gesteigert werden. Die Reaktion ergab das Produkt in einer Ausbeute von 937 mg (25%) als hellbraunen Schaum. Rf-Wert (Silica60, Laufmittel  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  9 : 1) = 0,89

### Beispiel 3

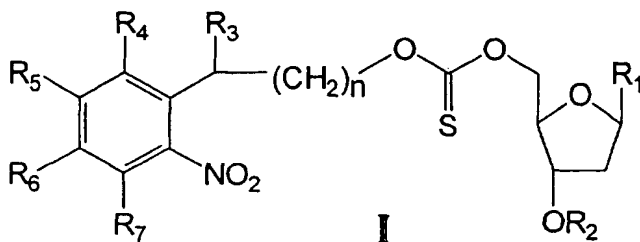
#### Abspaltung der Schutzgruppe

#### Zersetzung von 5'-O-(2-(2-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl)thymidin durch Bestrahlung mit UV-Licht

Zur Untersuchung der Zersetzungsgeschwindigkeit von 5'-O-(2-(2-Nitrophenyl)ethoxythiocarbonyl)thymidin wird 1 mg der Verbindung eingewogen, in 1 ml Methanol gelöst und in eine Quarzglasküvette (Durchlässigkeit im Wellenlängenbereich von 200 nm–2500 nm, Schichtdicke 1 cm) gefüllt. Die Bestrahlung erfolgt durch eine Quecksilberdampflampe der Firma ORIEL Instruments, Model 66057 (Leistung 250 W). Um ein übermäßiges Aufheizen der Küvette zu vermeiden, wird ein mit Wasser gefülltes IR-Filter vorgeschaltet. Die Küvette wird in einer Entfernung von etwa 20 cm von der Lampenoptik in den Strahlengang gebracht. Im Abstand von je einer halben Minute werden der Lösung 10 µl entnommen und mittels HPLC analysiert. Die Meßwerte sind in Fig. 1 dargestellt.

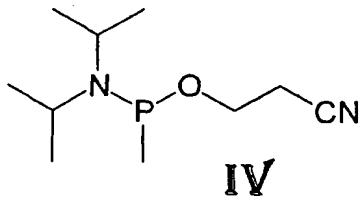
#### Patentansprüche

##### 1. Nucleosidderivate der allgemeinen Formel I



worin

R<sub>1</sub> eine Nucleobase oder eine mit mindestens einer Schutzgruppe versehene Nucleobase darstellt,  
R<sub>2</sub> ein H-Atom oder eine Diisopropylamino-(2-cyanoethoxy)-phosphinyl-Gruppe der Formel IV



bedeutet,

R<sub>3</sub> ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist,

R<sub>4</sub> ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder einen Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen darstellt,

R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> unabhängig voneinander ein H-Atom, ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen oder ein Alkoxyrest mit bis zu 4 C-Atomen bedeuten oder zusammen eine Methylendioxygruppe darstellen,

R<sub>7</sub> ein H-Atom oder ein Alkylrest mit bis zu 4 C-Atomen ist und

n die Zahl 0 oder 1 bedeutet.

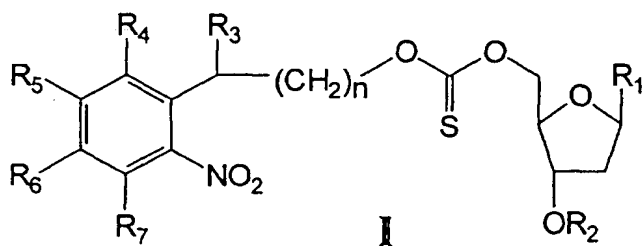
2. Nucleosidderivate gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>1</sub> Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin, Uracil oder Hypoxanthin ist, welche gegebenenfalls eine Schutzgruppe tragen.

3. Nucleosidderivate gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>3</sub> ein H-Atom, eine Methyl- oder eine Ethylgruppe ist.

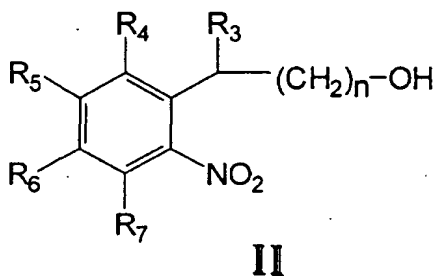
4. Nucleosidderivate gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>4</sub> ein H-Atom, eine Nitrogruppe oder eine Methylgruppe ist.

5. Nucleosidderivate gemäß einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß R<sub>5</sub> und R<sub>6</sub> unabhängig voneinander ein H-Atom oder eine Methyl-, Ethyl-, Methoxy- oder Ethoxygruppe darstellen oder zusammen eine Methylendioxygruppe bilden.

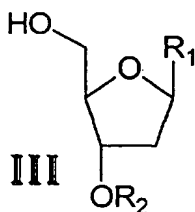
6. Verfahren zur Herstellung eines Nucleosidderivats der allgemeinen Formel I



worin die Reste  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  und  $R_7$  sowie  $n$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, wobei man in an sich bekannter Weise eine Verbindung der allgemeinen Formel II



worin die Reste  $R_3$ ,  $R_4$ ,  $R_5$ ,  $R_6$  und  $R_7$  sowie  $n$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, mit Thiophosgen umgesetzt und die so erhaltenen Thiocarbonylchloride mit einer Verbindung der allgemeinen Formel III



worin die Reste  $R_1$  und  $R_2$  die in Anspruch 1 angegebene Bedeutung haben, umsetzt.

7. Verwendung der Nucleosidderivate gemäß Anspruch 1 zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden.

8. Kit zur automatischen Synthese von Oligonucleotiden umfassend mindestens ein Nucleosidderivat gemäß Anspruch 1, gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nucleosidderivaten gemäß Anspruch 1 und Reagenz- und Hilfsstoffen sowie Lösemitteln und einer Arbeitsanweisung.

---

Hierzu 1 Seite(n) Zeichnungen

---

*Fig. 1*

